

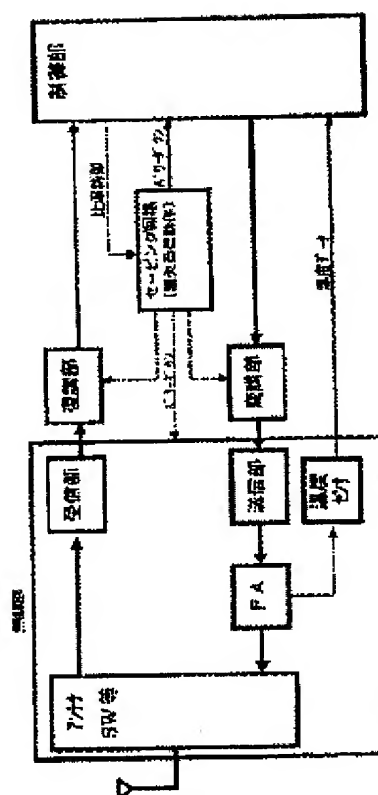
SAVING SYSTEM

Patent number: JP2004048321
Publication date: 2004-02-12
Inventor: KAWAMURA MASANORI; SAKAMOTO NORIYUKI
Applicant: HITACHI KOKUSAI ELECTRIC INC
Classification:
 - international: H04B1/40; H04B7/26
 - european:
Application number: JP20020202310 20020711
Priority number(s):

Abstract of JP2004048321

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a mobile wireless apparatus capable of revising an intermittent reception rate depending on temperature in such a way that the power-down time is extended by decreasing the intermittent reception rate when temperature is high and the power-down time is reduced by increasing the intermittent reception rate when temperature is low on the other hand.

SOLUTION: The mobile wireless apparatus includes: a temperature sensor for sensing a temperature of a device; a saving circuit for performing the intermittent reception operation; and a control circuit for monitoring the temperature so as to control the intermittent reception rate, and the control circuit changes the intermittent reception rate of the saving circuit in response to the temperature sensed by the temperature sensor as its control.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-202310
(P2002-202310A)

(43) 公開日 平成14年7月19日 (2002.7.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 1	G 0 1 N 33/543	5 2 1
33/531		33/531	Z

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2001-195134 (P2001-195134)	(71) 出願人	000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
(22) 出願日	平成13年6月27日 (2001.6.27)	(72) 発明者	箸本 弘一 神奈川県座間市東原5丁目1番83号 森永 乳業株式会社生物科学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2000-328941 (P2000-328941)	(72) 発明者	原田 義次 神奈川県座間市東原5丁目1番83号 森永 乳業株式会社生物科学研究所内
(32) 優先日	平成12年10月27日 (2000.10.27)	(72) 発明者	大久保 重敏 神奈川県座間市東原5丁目1番83号 森永 乳業株式会社生物科学研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 物質の検出試薬及び検出方法

(57) 【要約】

【課題】 調製が容易で、製造コストが安く、調製ロットの間でバラツキがなく、褪色し難くデータの保存性が良好な物質の検出試薬及び検出方法を提供する。

【解決手段】 展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させる溶液展開法及びそれに用いる物質の検出試薬において、参照領域が、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする。標識は、好ましくは有色微粒子であり、また、抗体又は抗原と結合していることが好ましい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させる溶液展開法に用いる物質の検出試薬において、参照領域に、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする検出試薬。

【請求項2】 標識が有色微粒子である請求項1に記載の検出試薬。

【請求項3】 標識が抗体又は抗原と結合している請求項1又は2に記載の検出試薬。

【請求項4】 検出試薬の展開担体がニトロセルロース膜である請求項1～3のいずれか1項に記載の検出試薬。

【請求項5】 所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、アルカリ金属塩を除く金属化合物が参照領域に含有されている請求項1～4のいずれか1項に記載の検出試薬。

【請求項6】 試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数備え、各参照領域で生じる信号の強度は、それぞれ、異なる所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等となるようにされている請求項5記載の検出試薬。

【請求項7】 展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させることを含む物質の検出方法において、参照領域が、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする検出方法。

【請求項8】 標識が有色微粒子である請求項7に記載の物質の検出方法。

【請求項9】 標識が抗体又は抗原と結合している請求項8に記載の検出方法。

【請求項10】 検出試薬の展開担体がニトロセルロース膜である請求項7～9のいずれか1項に記載の検出方法。

【請求項11】 所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、アルカリ金属塩を除く金属化合物が参照領域に含有されており、試験領域で生じる信号の強度と参照領域で生じる信号の強度とを比較することを含む請求項7～10のいずれか1項に記載の検出方法。

【請求項12】 試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数準備し、各参照領域で生じる信号の強度は、それぞれ、異なる所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等となるようにされている請求項11記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、溶液展開法を用い

る物質の検出に関し、より詳しくは、展開終了の確認または半定量的な測定が可能な、物質の検出試薬（試験片）及び検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 疾病の診断を行なうための手段としては、被検試料、例えば血清、尿等の体液、培養液、抽出液、糞便等に存在する原因物質（例えば抗原）、あるいはこれに関連する物質（例えば抗体）を検出する方法が一般的な方法であり、従来、抗原-抗体反応などの生物学的特異反応を利用することにより被検試料中の抗体や抗原などの被検物質の量が測定されている。このような検出法の一つとして、イムノクロマト法などの溶液展開法（クロマト法）がこれまでに提案されている（The Medical & Test Journal、第706号、第5頁、平成11年10月11日）。

【0003】 溶液展開法は、試料を試験片の一部に塗布し、通常は水のような展開液を用いて試料を試験片の材料に浸透させ展開することにより、試料中に存在する被検物質を検出する技術である。溶液展開法の一つであるイムノクロマト法では、試験領域において、被検物質とこれに対する物質との間で形成された免疫複合体を、標識付試薬を用いて検出する。

【0004】 溶液展開法においては、被検物質を含む展開液が試験片の試験領域に浸透し、展開が終了したか否か、即ち試験の終了を確認するために展開終了確認領域と呼ばれる特定部位を試験片に存在させることもできる。展開終了の信号は、試験結果の判定に際して該試験系が満足すべき要件、即ち「ある特定の展開液量が、標識付試薬とともに、ある時間をかけて試験領域を通過し、更に展開終了確認領域まで到達した」旨の事実を試験者に呈示する役割を担っており、試験者に対する試験終了の合図である。その信号の確認は試験結果に信頼性を与えるうえで重要である。例えば、試験の結果が陰性（反応なし）であると確定等するために重要である。

【0005】 展開終了の信号を確認する方法として、抗原-抗体反応する物質を展開終了確認領域に含ませる方法、pHの変化に伴い発色又は変色する指示薬を展開終了確認領域に含ませる方法等が知られている。

【0006】 また、溶液展開法は、その検出精度から、通常は定性的な判定方法として利用されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、前記の展開終了確認にかかわる従来技術において、抗原-抗体反応による特異的反応を利用する場合は、抗原又は抗体には生物学的材料を使用することとなり、調製に多くの労力が必要となり、製造コストが高いという問題がある。更に、調製ロットの間で一定の活性を得ることが困難であるという問題点もある。

【0008】 また、pHの変化に伴い発色又は変色する指示薬を使用する場合には、試験片の保存時に乾燥等する

と褪色し易くデータの保存性が悪いという問題点がある。

【0009】本発明の目的は、前記問題点のない、すなわち、調製が容易で、製造コストが安く、調製ロットの間でバラツキがなく、褪色し難くデータの保存性が良好な新規な展開終了の信号の確認方法を利用した新規な物質の検出試薬及び検出方法を提供することである。

【0010】本発明の別の目的は、溶液展開法に基づいた半定量的な測定を可能にする検出試薬および検出方法を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記従来技術に鑑みて、前記問題点のない、展開終了の信号を確認する方法を提供することを目的として、各種信号発生法について試験した。

【0012】その結果、本発明者らは、アルカリ金属塩を除く金属化合物をイムノクロマト法において一般的に常用されている展開担体であるニトロセルロース膜上に塗布すると、金属化合物が比較的強固に固定されるという事を見出した。即ち、ニトロセルロース膜上に塗布された金属化合物は、少なくともイムノクロマト法において一般的に常用されている緩衝液（水溶液）で展開しても、流出することなく塗布された位置に維持されることを見出した。

【0013】更に、本発明者らは、検討を重ねた結果、ニトロセルロース膜上の特定位置にアルカリ金属塩を除く金属化合物を塗布すると、展開液の液流自体には何ら影響がないが、展開液中に浮遊する微粒子に対し、その流れを阻止する効果があることを見出した。つまり、金コロイド、ラテックス等の有色微粒子により標識された蛋白質（標識体）等を展開液とともに展開すると、金属化合物を塗布した領域において標識体の流れが阻止され、標識体が集積される結果、拡散状態においては目視できなかった標識体の存在が視認可能となり、展開終了の信号を確認できることを見出した。

【0014】前記知見に基づいて、本発明者らは、実用化に向けて、鋭意検討を行なった結果、溶液展開法を用いる物質の検出において、展開終了の確認のための参照領域に、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有させ、かつ、参照領域に達する展開液に、参照領域に集積され得る標識が含まれるようにすることにより、前記の問題点を解決し、調製が容易で、製造コストが安く、調製ロットの間でバラツキがなく、褪色し難くデータの保存性が良好な物質の検出試薬及び検出方法を提供できることを見出した。

【0015】また、参照領域に、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有させることにより信号を発生させる場合、該金属化合物の含有量の調整により信号を所望の強度に容易に調整できることを見出した。これらの知見に基づき、本発明は完成された。

【0016】本願の第一の発明は、展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させる溶液展開法に用いる物質の検出試薬において、参照領域に、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする検出試薬（以下、「本発明検出試薬」ともいう）である。

【0017】本発明検出試薬において、標識は有色微粒子であることが好ましい。また、標識は抗体又は抗原と結合していることが好ましい。さらに、検出試薬の展開担体がニトロセルロース膜であることが好ましい。

【0018】また、本発明検出試薬においては、所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、アルカリ金属塩を除く金属化合物が参照領域に含有されていることが好ましい。この場合、本発明検出試薬は、試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数備え、各参照領域で生じる信号の強度は、それぞれ、異なる所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等となるようにされていることがさらに好ましい。

【0019】本願の第二の発明は、展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させることを含む物質の検出方法において、参照領域が、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする検出方法（以下、「本発明検出方法」ともいう）である。

【0020】本発明検出方法において、標識は有色微粒子であることが好ましい。また、標識は抗体又は抗原と結合していることが好ましい。さらに、検出試薬の展開担体がニトロセルロース膜であることが好ましい。

【0021】また、本発明検出方法は、所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、アルカリ金属塩を除く金属化合物が参照領域に含有されており、試験領域で生じる信号の強度と参照領域で生じる信号の強度とを比較することを含むことが好ましい。この場合、試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数準備し、各参照領域で生じる信号の強度は、それぞれ、異なる所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等となるようにされていることがさらに好ましい。

【0022】

【発明の実施の形態】次に、本発明について具体的に説明する。なお、本明細書において百分率は、特に断りのない限り重量による表示である。

【0023】本発明検出試薬は、展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させる溶液展開法に用いる物質の検出試薬において、参照領域に、アルカリ金属塩を除

く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする。

【0024】本発明検出試薬は溶液展開法に用いる物質の検出試薬の一種である。本発明検出試薬は、参照領域に、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることの他は、従来の検出試薬と同様の構成でよい。すなわち、本発明の検出試薬は、溶液展開法に用いる物質の検出試薬の各実施形態で実施可能であり、具体的には、検出試薬（試験片）の下端（上流域）に検体を受け入れるコンジュゲートパット（例えばミリポア社製等）を貼付すること、検出試薬（試験片）を合成樹脂製の支持体で支持すること、検出試薬（試験片）の上端（下流域）に展開液を吸収する吸収パットを貼付すること等が可能である。

【0025】溶液展開法とはクロマト法とも呼ばれる方法であり、溶液展開法においては、展開担体上に試験領域が設けられ、検出対象物質を含む展開液が展開担体を通して展開される。試験領域では、検出対象物質と検出対象物質に対する反応性物質との反応が生じ、この反応を検出することにより検出対象物質の検出がなされる。反応の検出は、典型的には、試験領域に固定化した反応性物質1と、標識化された反応性物質2とを用い、検出対象物質及び反応性物質2を含む展開液が展開担体上をペーパークロマト法と同様の現象によって展開され、展開担体上の反応性物質1の固定化部位（試験領域）に展開液が到達したときに反応性物質1と反応性物質2とが検出対象物質をサンドイッチ状に挟んだ複合体を形成し、このとき試験領域に生じた標識を検出することにより行われる。

【0026】上記反応性物質とは、抗体と抗原との反応、糖鎖とレクチンとの反応、リガンドとレセプターとの反応などの生物学的に特異的な反応に基づいて検出対象物質と反応する物質を意味する。

【0027】展開液は、水や緩衝液等であり、また、検出対象物質を含む検体をこれらに溶解したものであってもよい。検出対象物質を含む検体が液体である場合には、検体自体または検体の水や緩衝液等による希釈液も展開液となり得る。

【0028】臨床検査の領域において最も代表的なクロマト法として、標識化される反応性物質が抗体又は抗原であるイムノクロマト法が例示できる。イムノクロマト法は、典型的には、展開担体上に固定化した抗体1と、有色微粒子により標識化された抗体2を用いる方法であり、検出対象物質及び抗体2を含む展開液が展開担体上を展開し、展開担体上の抗体1の固定化部位（試験領域）に展開液が到達したときに抗体1と抗体2とが検出対象物質をサンドイッチ状に挟んだ複合体が形成され、このとき有色微粒子の色調が膜上に認められ、検出対象

物質の存在が肉眼で確認できるというものである。

【0029】参照領域は、展開の終了を確認するため、および／または、試験領域の信号を評価する際の基準となる信号すなわち参照信号を発生させるための領域である。

【0030】試験領域より下流域にある参照領域に含有される金属化合物は、試験領域における抗原抗体反応等に一切影響を及ぼすものではないことから、参照領域は試験領域よりも展開方向の下流域に存在することが好ましい。また、本発明検出試薬における参照領域が、展開の終了を確認するための領域である場合には、展開担体上の試験領域よりも展開方向の下流域に存在する必要がある。

【0031】本発明検出試薬におけるアルカリ金属塩を除く金属化合物としては、酢酸カルシウム・1水和物、酢酸ランタン・ n 水和物、塩化ランタン・7水和物、酢酸セリウム・1水和物、塩化セリウム(III)・7水和物、酢酸プラセオジウム・ n 水和物、酢酸ネオジウム・ n 水和物、酢酸エルビウム・4水和物、酢酸マンガン・4水和物、硫酸鉄(II)・7水和物、硫酸鉄(II)アンモニウム・6水和物、酢酸コバルト(II)・4水和物、酢酸ニッケル(II)・4水和物、酢酸銅(II)・1水和物、塩化銅(II)・2水和物、硫酸銅(II)・5水和物、酢酸亜鉛(II)・2水和物、酢酸カドミウム(II)・2水和物、酢酸アルミニウム（水溶性）、硫酸アルミニウム・カリウム・12水和物、酢酸鉛(II)・3水和物等の各種金属化合物を例示でき、これらの市販品を使用できる。尚、アルカリ金属塩を除くのは、後記する試験例からも明らかとなっており、臭化ナトリウム、塩化カリウム等のアルカリ金属の塩類は展開担体上に固定化することが困難であり、塗布しても展開液によって流出するため、有色微粒子等の標識の流れを阻止できないためである。また、過マンガン酸カリウム等の当初より強く着色している金属化合物、及び無水硫酸銅、無水塩化コバルト等の空気中の水分に触れるだけで容易に発色する金属化合物は、展開終了の信号を誤認、妨害等する可能性があることから、使用を避けた方が好ましい。従って、本発明に使用される金属化合物より、過マンガン酸カリウム、無水硫酸銅、無水塩化コバルトを除く方が好ましい。更に、後記する試験例からも明らかとなっており、有色微粒子として粒径が15nmと比較的小さな金コロイドを使用した場合にも、着色度に優れていることから、酢酸ランタン・ n 水和物、塩化ランタン・7水和物、酢酸セリウム・1水和物、塩化セリウム(III)・7水和物、酢酸プラセオジウム・ n 水和物、酢酸ネオジウム・ n 水和物、及び酢酸エルビウム・4水和物に代表されるランタニド元素からなる金属化合物、並びに硫酸鉄(II)・7水和物及び硫酸鉄(II)アンモニウム・6水和物に代表される鉄からなる金属化合物が特に好ましい。

【0032】展開担体としては、その上に塗布された上

記金属化合物が、展開液で展開しても塗布された位置に維持されるものである限りにおいて、クロマト法に使用可能な多孔質物質の膜を使用することができる。膜としては、ニトロセルロース膜が好ましく、好ましい態様であるイムノクロマト法において一般的に常用されている孔径3~12 μm のニトロセルロース膜を例示することができる。

【0033】上記金属化合物を参照領域に含有させる方法としては、上記金属化合物の水溶液を展開担体の参照領域に塗布する方法が挙げられる。以下、ニトロセルロース膜を展開担体として用いる、イムノクロマト法用の検出試薬の場合を例にとって説明する。

【0034】一般的に、イムノクロマト法では、ニトロセルロース膜に必要なタンパクを塗布した後、いわゆるブロッキング、及びその後の洗浄操作を行なうが、金属化合物の塗布はこれらの操作の後に行なう。金属化合物は、通常水溶性塩の水溶液として塗布するが、この場合溶液の表面張力を低下させ、静電的反発を減らす目的で、少量のアルコール類を添加して行なってもよい。通常、洗浄操作は、ドデシル硫酸ナトリウム等の湿潤剤を含有する、pH 7.5程度の弱塩基性の緩衝液を用いて行われる場合が多いが、本発明においてもこれを特に変える必要はなく、むしろ塗布前に弱塩基性の緩衝液による洗浄を行なっておくのが望ましい。塗布後は、35℃にて一晩乾燥させた後、室温で湿度30~50%条件下で保存する。

【0035】ニトロセルロース膜上への金属化合物の塗布量は、通常には、0.2~400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、好ましくは1.0~40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。

【0036】本発明検出試薬においては、塗布時の金属化合物濃度、塗布液の吐出量、塗布機の掃引速度等の調節によって塗布量を調整することにより、参照領域に生じる信号の強度を変化させることができる。例えば、所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、塗布量を調節することができる。

【0037】アルカリ金属を除く金属元素の多くは、水溶液中塩基性条件下で難水溶性の水酸化物、あるいは一部が水酸基に置き換わった塩基性塩を形成して沈殿することが知られている。また、空気中の炭酸ガスを吸収して難水溶性の異なる化学種に変化するものも知られている。従って、展開担体上に保持される最終的な化学種は、塗布時のままであるとは限らず、むしろ水に不溶性の塩に変化している可能性が高い。これは塗布した金属化合物によって当然異なるし、これを特定したとしても最終的な化学種は必ずしも明確ではない。しかしながら、上記金属化合物を塗布することによって本発明の効果が得られることから、塗布する金属化合物により表すことは適切と考えられる。

【0038】本発明検出試薬に使用される標識として

は、上記金属化合物を含む参照領域に集積され得る標識であれば、特に限定されない。参照領域に集積されるか否かは、後述の試験例1及び2のようにして決定することができる。

【0039】好ましい標識は、有色微粒子である。有色微粒子としては、金コロイド、ラテックス等が例示でき、比較的粒径の大きなものが好ましい。粒径は、電顕法による粒径で、通常には、3~500nm、好ましくは10~300nmである。金コロイドについては、粒径が少なくとも15nmのものが着色度合が優れるため、好ましい。

【0040】本発明検出試薬の参照領域における展開終了の信号または参照信号の発生は、展開液中の標識が、展開担体上に金属化合物を塗布等により含有させておくことによって、塞き止められ、流れが阻止されるなどして標識が集積されることにより検出可能（好ましくは視認可能）な信号が生じるという原理に基づいている。従って、集積の程度は、検出可能な展開終了の信号または参照信号を発生させるのに十分なものであればよい。また、標識は、参照領域に達する展開液に含まれていればよく、本発明検出試薬に適用される最初の展開液に含まれている必要はない。また、標識は、試験領域において捕捉されることなく通過した、標識された反応性物質における標識であってもよいし、これとは別の標識であってもよい。後者の場合には、例えば、最初の展開液に、反応性物質の標識に使用された標識と異なる標識を含ませてもよいし、試験領域と参照領域との間に、展開液により移動可能なように標識を展開担体上に含ませておいてもよい。

【0041】本発明検出試薬においては、所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、アルカリ金属を除く金属化合物が参照領域に含有されていることが好ましい。この場合、本発明検出試薬は、試験領域と参照領域と設けた展開担体を複数備え、各参照領域で生じる信号の強度は、それぞれ、異なる所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等となるようにされていることがさらに好ましい。

【0042】溶液展開法に用いる試薬の試験領域において発生する信号について、これを単独に目視によって信号強度を判定することは一般に困難である。一方、比較用にもう一つ別に信号を発生させ、両者の信号の強弱を比較判定することは、比較的容易である。本発明によれば、上述のように参照領域に生じる信号を所望の強度に調整可能であることを利用して、試験領域での信号強度を半定量的に判定し得る。すなわち、本発明検出試薬において、所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるようにした場合、試験領域と参照

領域とで生じる信号の強度の比較により、半定量的な測定を行うことができる。

【0043】以下、具体例を挙げて説明する。検出試薬の試験領域に、検出対象物質を認識する抗体を、ある一定量塗布する。この検出試薬に対し、検出対象物質を含む検体を、微粒子で標識化した別の抗体とともに展開すれば、検出対象物質は試験領域において捕捉されて信号を発生する。この時の信号強度は、展開液中の検出対象物質の濃度に依存的に変動するが、その強度から検出対象物質濃度を目視により判定することは一般に困難である。そこで、展開液中の検出対象物質の濃度が、例えば 500 ng/ml であるときの試験領域で発生する信号（以下、試験信号）の強度に対し、参照領域で発生する信号（以下、参照信号）の強度がそれと同等になるように、参照領域に塗布する金属化合物量を調整する。するとこの検出試薬に対して、展開液中の検出対象物質の濃度が、ちょうど 500 ng/ml である検体を展開したとき、試験領域と参照領域で発生する信号の目視強度が等しくなる。これに対し、もし展開液中の検出対象物質の濃度が 500 ng/ml 未満であれば、試験信号は先のもより弱くなり、逆に参照信号は強くなる。一方、展開液中の検出対象物質の濃度が 500 ng/ml 超過であれば、試験信号は先のもより強くなり、逆に参照信号は弱くなる。こうして、ストリップ上の試験信号と参照信号の強弱を比較することにより、展開液中の検出対象物質の濃度を、 500 ng/ml 程度であるのか、それを超過するのか、それ未満であるのか、を目視判定することが可能となる。

【0044】判定精度を上げるためには試験領域と参照領域とを設けた展開担体（ストリップ）の数を増やすことが好ましい。即ち、上の例で、試験領域に塗布する抗体量を一定にしておき、参照信号強度を、試験信号 500 ng/ml 相当のものに加えて、例えば 200 ng/ml 相当、及び 1500 ng/ml 相当のものを調製する。つまり、試験領域に塗布する抗体量は一定であるが、参照領域に塗布する金属化合物量の異なる3種類のストリップを用意する。即ち、参照信号の目視強度と試験信号の目視強度とが、検出対象物質濃度 200 ng/ml の検体液を展開したとき、ちょうど等しくなるもの、検出対象物質濃度 500 ng/ml の検体液を展開したとき、ちょうど等しくなるもの、そして検出対象物質濃度 1500 ng/ml の検体液を展開したとき、ちょうど等しくなるもの、の3種類である。以下、それぞれを、ストリップA、ストリップB、ストリップCと呼ぶ。そして、検出対象物質濃度が未知の検体について、この3種類のストリップで同時に展開する。

【0045】ストリップAにおいて試験領域と参照領域の発色信号強度を比べて、もし試験信号が参照信号より弱ければ、この検体中の検出対象物質濃度は約 200 ng/ml 未満であると判定することができる。もし試

験信号が参照信号より強ければ、ストリップBにおける試験信号と参照信号の強度を比べる。もし試験信号が参照信号より弱ければ、この検体中の検出対象物質濃度は約 200 ng/ml 超約 500 ng/ml 未満であると判定することができる。以下同様な手順によって、検体中の検出対象物質濃度を、約 200 ng/ml 未満、約 200 ng/ml 、約 200 ng/ml 超約 500 ng/ml 未満、約 500 ng/ml 、約 500 ng/ml ~ 約 1500 ng/ml 未満、約 1500 ng/ml / 1500 ng/ml 超、というようにランクに分けて半定量することができる。

【0046】本発明における参照領域で発生する信号は、目視比較が容易なことから、試験領域と質的に同等のものであることが好ましい。例えば、試験領域において捕捉されることなく通過した、標識された反応性物質における標識による信号である場合には、試験領域で発生する信号と同じく、同一の微粒子標識体の集積によって生じるものであり、両者の信号は質的に同等になる。

【0047】この試験領域における信号と、参照領域における信号の強度比較に基づき、検出対象物質を半定量する方法は、参照領域に抗体を塗布し、試験領域で捕捉されることなく通過した標識抗体を捕捉することによって信号を発生させる免疫化学反応によるものでも原理的には可能である。しかしながらこの場合、製造コストが高いという問題に加えて、生物学的材料故に調製ロット間で一定の活性を得るのが一般的に難しく、発生信号強度の再現性に難点がある。更に、参照領域において、試験信号と同等の強度を発生させるような適度な抗体の塗布調整には多大の労力を要し、実用化には困難が伴う。これに対し、本発明によれば、金属化合物の塗布量に対して発生する信号強度は安定した再現性を示すので、信号を所望の強度に調整することは容易である。

【0048】複数のストリップを備える本発明検出試薬の態様としては、複数のストリップが、放射状に配置されており、中心に設置された試料注入孔から試料（展開液）を注入することにより、一度の注入操作で、個々のストリップについて同時に展開可能な構造を有するものが挙げられる。この態様の本発明検出試薬によれば、半定量測定を行う際に、一つのストリップを備える検出試薬を複数用いた場合、ストリップの数だけ繰り返し行わなければならない試料の負荷・展開操作を、単回負荷・同時展開操作とすることが可能になる。これにより、測定の操作性が改善されると共に、繰り返し操作から発生し得る測定誤差を最小限に抑えることができる。

【0049】上記のような本発明検出試薬は、基板上に放射状にストリップを配置し、ストリップを固定するカバーをかぶせ、中心に試料注入孔構成部材により試料注入孔を設けることにより製造できる。

【0050】基板は、複数のストリップがその数に応じて中心から放射状（好ましくは放射状かつ対称的）に配

置できる構造を有する。図1に基板の一例を示す。図1に示す基板1では、三つのストリップが放射状かつ三回対称に配置できるように、凹部2が設けられている。基板の材料としては、通常には耐水性のあるものが使用され、例えば、合成樹脂、耐水性を有する（または耐水処理を施した）紙等が挙げられる。使用後の試薬の処理の点からは、紙製であることが好ましい。

【0051】凹部2はストリップを配置するためのものであり、中心の円形部とそれから放射状に延びる長方形部とからなり、凹部2の深さは通常2mm程度である。

【0052】基板の形状や凹部の配置は、特に限定されず、ストリップが二つの場合には、端部が円形とされていてもよい長方形や長楕円形が挙げられる。三つ以上の場合には、円形その他、数に応じて正三角形、正方形、正五角形、その他の形状も可能である（図2）。

【0053】基板の大きさは、使用するストリップの大きさに応じて選択されるが、円形の場合、その半径は通常5~10cm程度である。

【0054】図3に示されるように、ストリップ3は、その一端（展開方向の上流側）は基板中心にある凹部2の円形部に一部はみ出すように長方形部に配置される。中心の円形部は、試料（展開液）を一端保持するパッドを置くためのスペースである。円形部の大きさは、展開に必要な液量の保持に必要なパッドの体積により変わるが、通常は直径1~2.5cm程度である。長方形部の寸法は、使用するストリップ3の大きさに応じて選択されるが、幅は通常5.5~8.5mm程度である。

【0055】カバーは、上記基板上にストリップを配置した後、これを固定するために基板上に貼り付けられるものであり、板状でもフィルム状でもよい。カバーの材料は、基板と同様でよい。

【0056】図4に示すように、カバー4において、基板中心の凹部円形部に相当する部分は、同形状にくりぬかれている。ストリップを覆う部分については、試験領域と参照領域で発生する信号が観察できるように、透明とされるか、または、くりぬかれて、観察窓とされる。

【0057】観察窓の位置、形状、大きさ等は、試験信号と参照信号の両方が観察でき、対比が容易にできる限り、特に限定されない。但し、ストリップの上流側端部および展開液の展開を効率的に進行させるために最下流（最円周寄り）に装着される吸収パッド部分は、試料（血清、血漿、血液成分、尿等、または、それらの希釈液）が比較的多量に保持される部分であり、ハザード防止の観点から、これらの部分は不用意に触れることのないように完全に被覆されていることが好ましい。観察窓の配置例を図4のA~Cに示す。観察窓は、図4のCに示すように、試験領域用6と参照領域用5の二つに分離していてもよい。

【0058】カバー上には、各ストリップについての濃度を表す表示（例えば数字）を付すことが好ましい。

【0059】試料注入孔は試料注入孔構成部材により構成される。試料注入孔構成部材7は、例えば、図5のAおよびBに示すような、中心に窪んだ穴のある形状のものである。材料は合成樹脂等が挙げられる。図5のCに示すように、中心部の凹部円形部に、ストリップ3の端の上に載るようにパッド9を置き、このパッド9を圧着するように、カバー（図示しない）の中心のくりぬかれた部分に、試料注入孔構成部材7をはめ込むことにより試料注入孔8が設けられる。従って、試料注入孔8から試料が注入されると、この孔の直下にはパッド9が置かれており、パッド9は更に、放射状に配置された各ストリップ3の上流側端部と接触しているので、注入された試料は、一端このパッド9に吸収保持された後、徐々に各ストリップ3の下流へ向かって（中心から放射状に円周方向へ）展開する。

【0060】試料注入孔構成部材はカバーと一体になっていてもよい。この場合には、基板の円形部に、ストリップの端の上に載るようにパッドを置き、パッドを圧着するようにカバーが基板に貼り付けられる。

【0061】なお、上記の例では、ストリップを配置するための凹部は基板に設けられているが、凹部は、基板とカバーが貼り付けられたときにストリップを基板とカバーとの間に配置できる限り、カバーに設けてもよいし、基板とカバーの両方に設けてもよい。

【0062】イムノクロマト法の試験領域については、捕捉された免疫複合体の確認方法として、先に述べた有色微粒子を用いる代わりに、酵素標識を行い展開終了後にしかるべき発色処理を行って確認するものや、磁性微粒子で標識を行ない、該試験領域の磁気量を機械的に測定する方法等も提案されている。本発明は、これらの試験領域確認方法を用いた系における展開終了の確認法としても適用可能である。即ち、該試験系の試験領域における抗原-抗体反応には全く関与しない蛋白質成分等を、有色微粒子である金属コロイド、ラテックス等で標識しておき、これをあらかじめ展開液中に共存させ、該試験領域のさらに下流において、金属化合物を塗布した参照領域を設定しておくことにより、標識体を捕捉集積させ、それにより展開終了の信号を発生させることが可能である。

【0063】本発明検出方法は、展開液を、試験領域を通して参照領域まで展開させることを含む物質の検出方法において、参照領域が、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることを特徴とする物質の検出方法である。

【0064】本発明検出方法は溶液展開法の一つである。本発明検出方法は、参照領域が、アルカリ金属塩を除く金属化合物を含有し、かつ、参照領域に集積され得る標識が、参照領域に達する展開液に含まれることの他は、従来の検出方法と同様の構成でよい。

【0065】本発明検出方法における、展開液、試験領域、参照領域、アルカリ金属塩、参照領域に集積される標識、参照領域に達する展開液は、本発明検出試薬において説明した通りである。従って、本発明検出方法は、前記の本発明検出試薬を用いて実施することができる。

【0066】また、本発明検出方法は、所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等の強度の信号が参照領域で生じるように、アルカリ金属塩を除く金属化合物が参照領域に含有されており、試験領域で生じる信号の強度と参照領域で生じる信号の強度とを比較することを含むことが好ましい。この場合、試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数準備し、各参照領域で生じる信号の強度は、それぞれ、異なる所定量の検出対象物質を含む展開液が展開されたときに試験領域で生じる信号の強度と同等となるようにされていることがさらに好ましい。試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数準備する場合、試験領域と参照領域とを設けた展開担体を複数備えた本発明検出試薬を準備してもよいし、複数個の本発明検出試薬を準備してもよい。

【0067】

【実施例】次に試験例及び実施例を記載して本発明を更に詳述するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

【0068】

【試験例1】この試験は、各種金属化合物による展開終了の信号の発生の有無、並びに有色微粒子の種類及びその粒径の影響を調べるために行った。

【0069】(1) 金属化合物試料

- 試料1：酢酸カルシウム・1水和物（関東化学社製）
- 試料2：酢酸ランタン・n水和物（和光純薬社製）
- 試料3：塩化ランタン・7水和物（関東化学社製）
- 試料4：酢酸セリウム・1水和物（和光純薬社製）
- 試料5：塩化セリウム(III)・7水和物（関東化学社製）
- 試料6：酢酸プラセオジウム・n水和物（和光純薬社製）
- 試料7：酢酸ネオジウム・n水和物（和光純薬社製）
- 試料8：酢酸エルビウム・4水和物（和光純薬社製）
- 試料9：酢酸マンガン・4水和物（関東化学社製）
- 試料10：硫酸鉄(II)・7水和物（和光純薬社製）
- 試料11：硫酸鉄(II)アンモニウム・6水和物（和光純薬社製）
- 試料12：酢酸コバルト(II)・4水和物（関東化学社製）
- 試料13：酢酸ニッケル(II)・4水和物（関東化学社製）
- 試料14：酢酸銅(II)・1水和物（関東化学社製）
- 試料15：塩化銅(II)・2水和物（関東化学社製）
- 試料16：硫酸銅(II)・5水和物（関東化学社製）

- 試料17：酢酸亜鉛(II)・2水和物（関東化学社製）
- 試料18：酢酸カドミウム(II)・2水和物（関東化学社製）
- 試料19：酢酸アルミニウム（水溶性）（ナカライテスク社製）
- 試料20：硫酸アルミニウム・カリウム・12水和物（ナカライテスク社製）
- 試料21：酢酸鉛(II)・3水和物（関東化学社製）
- 試料22：臭化ナトリウム（和光純薬社製）
- 試料23：塩化カリウム（和光純薬社製）

【0070】(2) 検出試薬試料の調製

(a) 金属化合物のニトロセルロース膜への塗布
ニトロセルロース膜（ミリポア社製：SRHF、200mm×200mm）を0.01%ドデシル硫酸ナトリウム含有5mMリン酸緩衝液（pH7.5）中で15分間振盪し、35℃にて一晚乾燥した。このニトロセルロース膜を、ヨコ200mm×タテ30mmに裁断し、長辺の一端（以下、これを上端とする）から8mmの位置に、塗布機（IVEK社製）を用いて前記金属化合物試料の水溶液をそれぞれ塗布した。各金属化合物試料は、各々20mgを小容器に秤量し、蒸留水1000μlに溶解させ、イソプロピルアルコール50μlを添加して混合した後、0.45μmのフィルターを通して塗布用水溶液とした。塗布機は、掃引速度：2.0cm/sec、塗布液の吐出量：2.0μl/sec、すなわちニトロセルロース膜上の塗布量：1μl/cm（金属化合物換算で約20μg/cm）、塗布幅：約0.8mmで、前記塗布液を塗布した。

【0071】(b) 標識抗体の調製

後記する参考例1及び3の方法にほぼ従って、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を、次に示す各種粒径の金コロイド又はラテックスで感作標識した。
金コロイド：粒径8.5nm、15nm、25nm、及び40nm
ラテックス：粒径190nm、及び300nm

【0072】(c) 展開液の調製

次の①、②及び③の各液を体積比75：20：5の割合で混合したものを展開液として用いた。

- ① 10mMトリス-150mM NaCl（pH7.6）（以下、10mM TBS（pH7.6）と略記する。）
- ② 10% Tween 20-10mM TBS（pH7.6）
- ③ 各標識化抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体液

【0073】(3) 試験方法

前記各金属化合物試料を塗布したニトロセルロース膜を塗布方向と垂直方向に5mm幅に裁断して試験片とした。マイクロプレートに前記展開液40μlをとり、前記試験片の下端（塗布位置から遠い方の端）を浸け、展開させた。展開液が試験片上端に達した時点をもって展開終了とし、金属化合物試料を塗布した位置における標識抗体の集積による着色状態を判定した。尚、各試料の着色状態は、次の判定方法により、同一金属化合物試料毎に5試験片を用いて判定した。

【0074】(a) 着色状態の判定方法

各試験片の展開終了確認のための参照領域（金属化合物試料を塗布した位置）の着色状態を次のとおり判定した。

【0075】肉眼観察により、着色なし（0点）、着色ややあり（1点）、着色あり（2点）、着色強くあり（3点）の4段階に評価し、評価点の平均値から、0.5点未満をなし、0.5点以上1.5点未満をややあり、1.5点以上2.5点未満をあり、及び2.5点以上3.0点未満を強くありと判定した。

【0076】（4）試験結果

この試験の結果を表1に示す。表1から明らかとなり、金属化合物が臭化ナトリウム、塩化カリウム等のアルカリ金属塩の場合には、着色がなく展開終了の信号の発生が認められないことが判明した。また、有色微粒子として金コロイドに比較して粒径の大きなラテックスが着色度合に優れることが判明した。更に、金コロイドについては、粒径が少なくとも15nmの金コロイドが着色度合に優れることが判明した。また、金属化合物として、酢酸ランタン・n水和物、塩化ランタン・7水和

物、酢酸セリウム・1水和物、塩化セリウム（III）・7水和物、酢酸プラセオジム・n水和物、酢酸ネオジム・n水和物、酢酸エルビウム・4水和物、硫酸鉄（II）・7水和物、又は硫酸鉄（II）アンモニウム・6水和物を使用した場合に、有色微粒子として粒径が15nmと比較的小さな金コロイドを使用した場合にも、着色度が優れていることから、これらの金属化合物が好ましいことが判明した。

【0077】尚、前記各検出試薬試料の調製において、ニトロセルロース膜の種類、標識体の種類、又は展開液の種類を適宜変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0078】また、有色微粒子としてラテックスを使用し、アルカリ金属塩、過マンガン酸カリウム、無水硫酸銅、及び無水塩化コバルトを除く金属化合物について、その種類を適宜変更して試験したが、着色ありというほぼ同様の結果が得られた。

【0079】

【表1】

表1

試験番号	金コロイド				ラテックス	
	8.5nm	15nm	25nm	40nm	190nm	300nm
1	あり	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
2	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
3	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
4	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
5	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
6	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
7	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
8	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
9	ややあり	あり	あり	あり	強くあり	強くあり
10	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
11	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
12	なし	なし	なし	なし	あり	あり
13	なし	なし	なし	なし	あり	あり
14	ややあり	あり	あり	あり	強くあり	強くあり
15	ややあり	あり	あり	あり	強くあり	強くあり
16	ややあり	あり	あり	あり	強くあり	強くあり
17	ややあり	ややあり	ややあり	ややあり	あり	あり
18	ややあり	ややあり	ややあり	ややあり	あり	あり
19	なし	なし	なし	なし	強くあり	強くあり
20	なし	なし	なし	なし	強くあり	強くあり
21	あり	あり	強くあり	強くあり	強くあり	強くあり
22	なし	なし	なし	なし	なし	なし
23	なし	なし	なし	なし	なし	なし

【0080】

【試験例2】この試験は、ニトロセルロース膜上への金属化合物の塗布量と着色度合との関係を調べるために行なった。

【0081】(1) 金属化合物試料

酢酸ランタン・n水和物(和光純薬社製)

【0082】(2) 検出試薬試料の調製

(a) 金属化合物のニトロセルロース膜への塗布

ニトロセルロース膜上への金属化合物試料の塗布量を20、5、1.25、0.63、及び0.16 $\mu\text{g}/\text{cm}$ に変更したことを除き、前記試験例1に記載の塗布方法により塗布した。

(b) 標識抗体の調製

粒径190nmのラテックスを使用したことを除き、前記試験例1に記載の調製方法で調製した。

(c) 展開液の調製

前記試験例1に記載の調製方法で調製した。

【0083】(3) 試験方法

各試料の着色状態を、前記試験例1に記載の判定方法により各試料毎に5試験片を用いて判定した。

【0084】(4) 試験結果

この試験の結果を表2に示す。表2から明らかとなり、ニトロセルロース膜上への金属化合物の塗布量とし

では、少なくとも1.25 $\mu\text{g}/\text{cm}$ である場合に、着色度合が優れることが判明した。

【0085】尚、前記各検出試薬試料の調製において、ニトロセルロース膜の種類、標識体の種類、又は展開液の種類を適宜変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0086】また、アルカリ金属塩、過マンガン酸カリウム、無水硫酸銅、及び無水塩化コバルトを除く金属化合物について、その種類を適宜変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0087】

【表2】

表2

試薬の塗布量 ($\mu\text{g}/\text{cm}$)	着色度合
20	強くあり
5	強くあり
1.25	強くあり
0.63	あり
0.16	あり

【0088】

【参考例1】(ラテックス標識化抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体の調製) 抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(日本バイオテスト社製、10mg/ml) 34.5 μl に、粒径(電顕法により測定した粒子の直径)が190nmのポリスチレン製赤色ラテックス粒子(JSR社製、10w/v%) 0.1ml、及び、緩衝液0.9mlを添加し、室温で一昼夜攪拌し、次いで4℃で遠心分離(15000回転、20分間)、沈殿を0.5%牛血清アルブミン(シグマ社製)及び0.1%アジ化ナトリウム(ナカライテスク社製)を含む緩衝液に懸濁し、超音波処理により分散させ、ヒト血清アルブミンと特異的に結合するモノクローナル固定ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0089】

【参考例2】(ウサギ抗ヒトラクトフェリン-ポリクローナル抗体の調製) 免疫原として、ヒトラクトフェリン(Sigma社製; L-0520)の生理食塩水溶液(4mg/ml)と等量のフロイント完全アジュバント(Difco社製)を混合し、油中水型に乳化したものを、日本白色種ウサギ(体重3kg; 雄)に対して皮内注射(ヒトラクトフェリンとして2mg)することにより免疫を行った。以後、抗体価をモニターしつつ、4週間の間隔をおきながら追加免疫(一回当たりヒトラクトフェリンとして0.5mg)を行った。抗体価の上昇が確認できた時点で追加免疫を中止し、採血を行い、抗血清を得た。この抗血清に対して50%飽和硫酸塩析を行い、IgG粗画分を得た。得

られた画分を10mMリン酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、予め同一の緩衝液で平衡化したセファデックスG-25カラムを使用してゲル濾過し、免役グロブリン画分を得て、これを凍結乾燥し、保存した。

【0090】

【参考例3】(金コロイド標識化抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体の調製) マウス抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体(Hytest社製: 4L2, clone: 2B8、リン酸緩衝液 pH 7.4) 1.0mlを2mM Na₂B₄O₇緩衝液(pH 9.0)に対して4℃にて一晩透析した。

【0091】粒径が15nmの金コロイド液(British Biocell社製: EMGC15) 20mlに0.2M炭酸カリウム水溶液を加えてpH 9.0に調整し、上記抗体液264 μl を加えて10分間静置した。次いで10% BSA 2mlを添加して10分間静置した後、遠心分離(35000回転、1時間)、上清を除去した。沈渣に1% BSAを含有する20mM TBS (20mM Tris-150mM NaCl, pH 8.0) 20mlを加えて、再び遠心分離(35000回転、1時間)、上清を除去した。沈殿した金コロイド標識化抗体を、1% BSA及び0.05%アジ化ナトリウム(ナカライテスク社製)を含有する20mM TBSにて、全量が1mlとなるように懸濁し、4℃にて保存した。

【0092】

【実施例1】[検出試薬(試験片)の調製]

(1) ニトロセルロース膜上試験領域への抗ヒトアルブミン-ポリクローナル抗体の塗布

抗ヒトアルブミン-ポリクローナル抗体(Bethyl社製; 10mMリン酸緩衝液-150mM NaCl)を、10mMリン酸緩衝液(pH 7.4)にて25倍希釈し、イソプロピルアルコールの最終的な濃度が5%v/vとなる量のイソプロピルアルコールを添加して混合した後、0.45 μm のフィルターを通して塗布用液とした。

【0093】ニトロセルロース膜(ミリポア社製: SRH F)を、ヨコ200mm×タテ30mmに裁断し、長辺の一端(以下、これを下端とする)から12mmの位置に、塗布機(IV EK社製)を用いて掃引速度: 2.0cm/sec、塗布液の吐出量: 2.0 $\mu\text{l}/\text{sec}$ 、即ちニトロセルロース膜上の塗布量: 1 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 、塗布幅: 約0.8mmで、前記塗布液を塗布した。

【0094】塗布後35℃にて2時間乾燥し、0.5%ポリビニルピロリドンK-15水溶液中で15分間振盪させてブロッキングを行ない、次いで、0.01%のドデシル硫酸ナトリウムを含有する5mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中で15分間振盪させて洗浄した後、35℃にて一晩乾燥した。

【0095】(2) ニトロセルロース膜上参照領域への酢酸ランタン・n水和物の塗布

酢酸ランタン・n水和物(和光純薬工業社製)を蒸留水に溶解し、0.2mg/ml濃度の水溶液を調製し、イソプロピルアルコールの最終的な濃度が5%v/vとなる量のイソプロピルアルコールを添加して混合した後、0.45 μm のフィルターを通して塗布用液とした。

【0096】前記第(1)項で調製したニトロセルロース膜に対し、上端から8mmの位置に、前記酢酸ランタン塗布液を、塗布機(IVEK社製)を用いて掃引速度: 2.0 cm/sec、塗布液の吐出量: $2.0 \mu\text{l}/\text{sec}$ 、即ちニトロセルロース膜上の酢酸ランタンの塗布量: $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ (酢酸ランタン・n水和物換算で約 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}$)、塗布幅: 約0.8mmで塗布した。

【0097】塗布後、35℃にて一晩乾燥した後、室温にて湿度30~50%の条件下に保存した。次いで、塗布方向と垂直方向に5mm幅に裁断して、イムノクロマト用検出試薬(試験片)を得た。

【0098】[検出方法]

(1) 検出対象物質としてのヒトアルブミン溶液
ヒトアルブミン(シグマ社製) 5.0mgを秤量し、10mM トリス-150mM NaCl (pH 7.4) (以下、10mM TBS (pH 7.4) と略記する。)に溶解させて全量を1.0mlとした。これを原液として、10mM TBS (pH 7.4) にて順次希釈し、次の濃度の溶液を調製した。

(a) $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(b) $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(c) $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(d) $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(e) $0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、及び(f) $0 \mu\text{g}/\text{ml}$

【0099】(2) 標識抗体

標識化抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体として、前記参考例1に記載の方法に従って調製したラテックス標識化抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を使用した。

【0100】(3) 展開液

下記①、②、③及び④の各液を体積比65:20:10:5の割合で混合したものを展開液として用いた。

①10mM TBS (pH7.6)

②10% Tween 20-10mM TBS (pH7.6)

③各濃度のヒトアルブミン溶液

④標識化抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体液

従って、各展開液中の検出対象物質であるヒトアルブミンの最終濃度は、前記第(1)項に記載したヒトアルブミン溶液の濃度の10分の1となる。

【0101】(4) 検出操作

マイクロプレートに前記展開液 $40 \mu\text{l}$ をとり、前記検出試薬(試験片)の下端を浸け、展開させた。展開液が試験片上端に達した時点をもって展開終了とし、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を塗布した試験領域、及び、酢酸ランタン水溶液を塗布した参照領域における標識抗体の集積による着色状態を評価した。

【0102】[検出結果]

(1) 試験領域の着色

検出対象物質であるヒトアルブミン濃度に対して用量依存的な着色が認められた。

【0103】(2) 参照領域の着色

検出試験を行なった全てのヒトアルブミン濃度において、ラテックスにより標識された標識抗体の流れが酢酸

ランタンを塗布した部位(参照領域)で阻止され、標識抗体の集積によるバンドの生成が視認でき、展開終了の信号が発生した。この参照領域の信号強度は、検出対象物質であるヒトアルブミン濃度が高くなるに従って、即ち、試験領域の着色強度が強くなるに従って、これに相反して減弱することが認められたが、展開終了の確認に影響を及ぼすものではなかった。

【0104】

【実施例2】[検出試薬(試験片)の調製]

(1) ニトロセルロース膜上試験区域への抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体の塗布

前記参考例2に記載の方法に従って調製したウサギ抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体溶液に、イソプロピルアルコールの最終的な濃度が5%v/vとなる量のイソプロピルアルコールを添加して混合した後、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを通して塗布用液とした。

【0105】ニトロセルロース膜(ミリポ社製:SRH F)を、ヨコ200mm×タテ30mmに裁断し、長辺の一端(以下、これを下端とする)から12mmの位置に、塗布機(IVEK社製)を用いて掃引速度: 2.0cm/sec、塗布液の吐出量: $2.0 \mu\text{l}/\text{sec}$ 、即ちニトロセルロース膜上の塗布量: $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ 、塗布幅: 約0.8mmで、前記塗布液を塗布した。

【0106】塗布後35℃にて2時間乾燥し、0.5%ポリビニルピロリドンK-15水溶液中で15分間振盪させてブロッキングを行ない、次いで、0.01%のドデシル硫酸ナトリウムを含有する5mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中で15分間振盪させて洗浄した後、35℃にて一晩乾燥した。

【0107】(2) ニトロセルロース膜上参照領域への塩化セリウム(III)・7水和物の塗布

塩化セリウム(III)・7水和物(関東化学社製)を蒸留水に溶解し、 $0.2 \text{mg}/\text{ml}$ 濃度の水溶液を調製し、イソプロピルアルコールの最終的な濃度が5%v/vとなる量のイソプロピルアルコールを添加して混合した後、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターを通して塗布用液とした。

【0108】前記第(1)項で調製したニトロセルロース膜に対し、上端から8mmの位置に、前記塩化セリウム塗布液を、塗布機(IVEK社製)を用いて掃引速度: 2.0 cm/sec、塗布液の吐出量: $2.0 \mu\text{l}/\text{sec}$ 、即ちニトロセルロース膜上の塩化セリウムの塗布量: $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ (塩化セリウム(III)・7水和物換算で約 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}$)、塗布幅: 約0.8mmで塗布した。

【0109】塗布後、35℃にて一晩乾燥した後、室温にて湿度30~50%の条件下に保存した。次いで、塗布方向と垂直に5mm幅に裁断して、イムノクロマト用検出試薬(試験片)を得た。

【0110】[検出方法]

(1) 検出対象物質としてのヒトラクトフェリン溶液
ヒトラクトフェリン(シグマ社製:L0520) 4.5mgを秤量し、10mM TBS (pH 7.4) $1125 \mu\text{l}$ に溶解させ($4 \text{mg}/\text{ml}$

1)、この50 μ lに10mMトリス-150mM NaCl (pH8.0。以下、10mM TBS (pH 8.0) と略記する。) 950 μ lを加えたものを原液 (200 μ g/ml) として、10mM TBS (pH 8.0) にて順次希釈し、次の濃度の溶液を調製した。

(a) 128 μ g/ml、(b) 32 μ g/ml、(c) 8.0 μ g/ml、(d) 2.0 μ g/ml、(e) 0.5 μ g/ml、及び (f) 0 μ g/ml

【0111】 (2) 標識抗体

標識化抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体として、前記参考例3に記載の方法に従って調製した金コロイド標識化抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体を使用した。

【0112】 (3) 展開液

下記①、②、③、④の各液を体積比65:20:10:5の割合で混合したものを展開液として用いた。

①10mM TBS (pH8.0)

②10% Tween 20-10mM TBS (pH8.0)

③各濃度のヒトラクトフェリン溶液

④標識化抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体液
従って、各展開液中の検出対象物質であるヒトラクトフェリンの最終濃度は、前記第(1)項に記載したヒトラクトフェリン溶液の濃度の10分の1となる。

【0113】 (4) 検出操作

マイクロプレートに前記展開液40 μ lをとり、前記検出試薬 (試験片) の下端を浸け、展開させた。展開液が試験片上端に達した時点をもって展開終了とし、抗ヒトラクトフェリンモノクローナル抗体を塗布した試験領域、並びに塩化セリウム水溶液を塗布した参照領域における標識抗体の集積による着色状態を評価した。

【0114】 [検出結果]

(1) 試験領域の着色

検出対象物質であるヒトラクトフェリン濃度に対して用量依存的な着色が認められた。

【0115】 (2) 参照領域の着色

検出試験を行なった全てのヒトラクトフェリン濃度において、金コロイドにより標識された標識抗体の流れが塩化セリウム水溶液を塗布した部位 (参照領域) で阻止され、標識抗体の集積によるバンドの生成が視認でき、展開終了の信号が発生した。この参照領域の信号強度は、検出対象物質であるヒトラクトフェリン濃度が高くなるに従って、即ち、試験領域の着色強度が強くなるに従って、これに相反して減弱することが認められたが、展開終了の確認に影響を及ぼすものではなかった。

【0116】

【実施例3】 [検出試薬 (試験片) の調製]

(1) 抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体のニトロセルロース膜上試験領域への塗布

抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体液 (日本バイオテスト社製 #303、10mMリン酸緩衝液-150mM NaCl、pH 7.2中、10 μ g/ μ l) 90 μ lを取り、10mM

リン酸緩衝液 (pH 7.2) 765 μ l及びイソプロピルアルコール (以下、IPAと記す) 45 μ lを加えて混合することにより10倍希釈して、塗布液 (抗体濃度: 1.0 μ g/ μ l) とした。

【0117】ニトロセルロース膜 (ミリポア社製: SN HF) をヨコ200mm×タテ25mmに裁断し、長辺の一端 (以下、これを下端とする) から8mmの位置に、塗布機 (IVEK社製) を用いて、掃引速度: 5.0cm/sec、塗布液の吐出量: 2.0 μ l/sec、即ちニトロセルロース膜上の塗布量: 0.4 μ l/cm、塗布幅約0.4mmで、前記塗布液を塗布した。

【0118】塗布後、35℃にて2時間乾燥し、0.5%ポリビニルピロリドンK-15水溶液中で15分間振盪させてブロッキングを行ない、次いで0.01%ドデシル硫酸ナトリウム含有5mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で15分間振盪させて洗浄した後、35℃にて一晩乾燥した。

【0119】 (2) 酢酸ランタンのニトロセルロース膜上参照領域への塗布

酢酸ランタン・n水和物 (和光純薬工業社製) 30.0mgを秤量し、蒸留水1500 μ lに完全に溶解させた後、0.45 μ mフィルターを通してろ過して、原液とした。この原液200 μ lに蒸留水750 μ l及びIPA50 μ lを加えて混合し、塗布液A (酢酸ランタン濃度: 4.0 μ g/ μ l) を調製した。次いで、原液17.5 μ lに蒸留水775 μ l及びIPA50 μ lを加えて混合し、塗布液B (酢酸ランタン濃度: 3.5 μ g/ μ l) を調製した。更に原液150 μ lに蒸留水800 μ l及びIPA50 μ lを加えて混合し、塗布液C (酢酸ランタン濃度: 3.0 μ g/ μ l) を調製した。以下、同様の手順によって原液と蒸留水の量を変えることにより、IPAの最終濃度が5%v/vである塗布液D (酢酸ランタン濃度: 2.5 μ g/ μ l)、塗布液E (酢酸ランタン濃度: 2.0 μ g/ μ l)、塗布液F (酢酸ランタン濃度: 1.5 μ g/ μ l)、塗布液G (酢酸ランタン濃度: 1.0 μ g/ μ l)、塗布液H (酢酸ランタン濃度: 0.5 μ g/ μ l)、塗布液I (酢酸ランタン濃度: 0.24 μ g/ μ l)、及び塗布液J (酢酸ランタン濃度: 0.12 μ g/ μ l) を調製した。

【0120】前記(1)項で調製した、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を塗布済みのニトロセルロース膜に対し、上端から8mmの位置に、上記5%IPA含有酢酸ランタン水溶液 (塗布液A~J) を、塗布機 (IVEK社製) を用いて、掃引速度: 5.0cm/sec、塗布液の吐出量: 2.0 μ l/sec、即ちニトロセルロース膜上に塗布液量: 0.4 μ l/cm、塗布幅約0.4mmで塗布した。塗布後35℃にて一晩乾燥した後、室温にて湿度30~50%の条件下に保存した。

【0121】次いで、塗布方向と垂直方向に5mm幅に裁断して、イムノクロマトグラフィー用検出試薬 (試験

片)を得た。つまり、ニトロセルロース膜参照領域上の酢酸ランタンの塗布量が、 $1.6 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片A)、 $1.4 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片B)、 $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片C)、 $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片D)、 $0.8 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片E)、 $0.6 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片F)、 $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片G)、 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片H)、 $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片I)、及び $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}$ (試験片J) のものを其々調製した。

【0122】[検出方法]

(1) 検出対象物質としてのヒトアルブミン溶液の調製
ヒトアルブミン (シグマ社製) 5.0mg を秤量し、 10mM トリス- 150mM NaCl (pH 7.6、以下、 10mM TBS (pH 7.6) と略記する。) に溶解させて全量を 1.0ml とした。これを原液として 10mM TBS (pH 7.6) にて順次希釈して、次の濃度の溶液を調製した。

(a) $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(b) $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(c) $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(d) $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(e) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(f) $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(g) $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(h) $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(i) $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(j) $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、(k) $0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、及び (l) $0 \mu\text{g}/\text{ml}$

【0123】(2) 標識抗体

抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体 (日本バイオテクト社製 #301) 及び粒径 190nm ポリスチレン製赤色ラテックス粒子 (JSR社製) を用いて、参考例1に記載したのと同じの方法により標識抗体液を得た。

【0124】(3) 展開液

下記、①、②、③及び④の各液を体積比 $65:20:10:5$ の割合で混合したものを展開溶液として用いた。

① 10mM TBS (pH 7.6)

② 5% Tween 80- 10mM TBS (pH 7.6)

③ 上記(1)で調製した各濃度のヒトアルブミン溶液

④ 上記(2)で調製した標識化抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体液

【0125】従って、各展開溶液中の検出対象物質であるヒトアルブミンの最終濃度は、上記(1)で調製した各ヒトアルブミン溶液の濃度の 10 分の 1 となる。

【0126】(4) 検出操作

マイクロプレートに上記展開液 $40 \mu\text{l}$ をとり、前記検出試薬 (試験片) の下端を浸け、展開させた。展開液が試験片上端に達した時点をもって展開終了とし、抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を塗布した試験領域での発色信号強度と、酢酸ランタンを塗布した参照領域での発色信号強度とを比較した。

【0127】[結果] 上記(2)で調製した、参照領域における酢酸ランタン塗布濃度の異なる試験片A~Jについて、種々の濃度のヒトアルブミンを含む溶液を展開し

た。その結果は以下の通りであった。

1. 試験片Cに対して、ヒトアルブミン濃度が $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を展開したとき、試験信号と参照信号はほぼ等しい強度を示した。

2. 試験片Dに対して、ヒトアルブミン濃度が $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を展開したとき、試験信号と参照信号はほぼ等しい強度を示した。

3. 試験片Eに対して、ヒトアルブミン濃度が $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を展開したとき、試験信号と参照信号はほぼ等しい強度を示した。

4. 試験片Iに対して、ヒトアルブミン濃度が $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を展開したとき、試験信号と参照信号はほぼ等しい強度を示した。

【0128】また、この免疫化学測定系における、ヒトアルブミンの検出限界は $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ 近辺と判断された。一方、ヒトアルブミン濃度が $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の展開液では、いわゆるプロゾーン現象が出現し、ヒトアルブミン濃度が $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の展開液に比べて、明らかな試験信号の低下が認められた。

【0129】以上から、本ヒトアルブミン検出系の適正検出範囲は、 $0.05 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であると認められる。これらのストリップによる半定量能について、さらに検証を行なった。

【0130】即ち、上述の結果を基に、試験片I、試験片E及び試験片Dの3種類のストリップによる、検体中のヒトアルブミン濃度の半定量測定について検討した。

【0131】ヒトアルブミンの最終濃度が $0.05 \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度既知の溶液を新たに調製し、上記3種のストリップに対して同時に展開し、その試験信号と参照信号の強度を、目視にて比較判定することにより、各溶液のヒトアルブミン濃度を、① 約 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ より低、② 約 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、③ 約 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と約 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ との間、④ 約 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、⑤ 約 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ と約 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間、⑥ 約 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、そして⑦ 約 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ より高、の七つのランクへの類別を試み、その判定精度について検討した。その結果、いずれの溶液においても、3回の試行について、再現性よく、ランク付けできることが確かめられた。

【0132】

【発明の効果】以上詳記したとおり、本発明により奏せられる効果は次のとおりである。

1) 本発明の物質の検出試薬は、調製が容易で、製造コストが安く、展開終了の信号および/または参照信号に調製ロットの間でバラツキがない。

2) 本発明の物質の検出試薬は、展開終了の信号および/または参照の信号が褪色し難くデータの保存性が良好である。

3) 本発明の物質の検出方法によれば、参照領域を展開終了の確認に用いた場合には、展開終了の信号を確定

に確認できる。

4) 本発明の物質の検出方法によれば、参照領域を参照信号の発生に用いた場合には、半定量的な測定を簡便かつ容易に実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 複数のストリップを備える本発明検出試薬を

構成する基板の一例を示す。

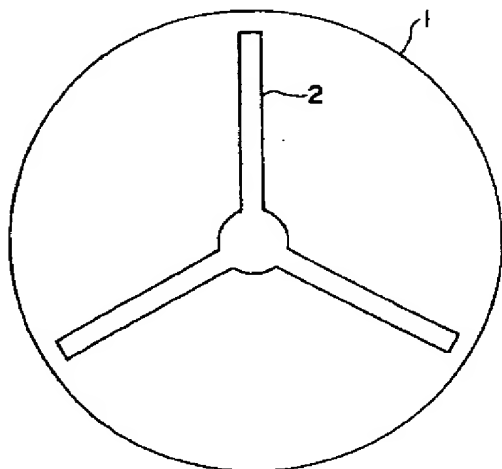
【図2】 基板の形状および凹部の配置の例を示す。

【図3】 ストリップを配置した図1の基板を示す。

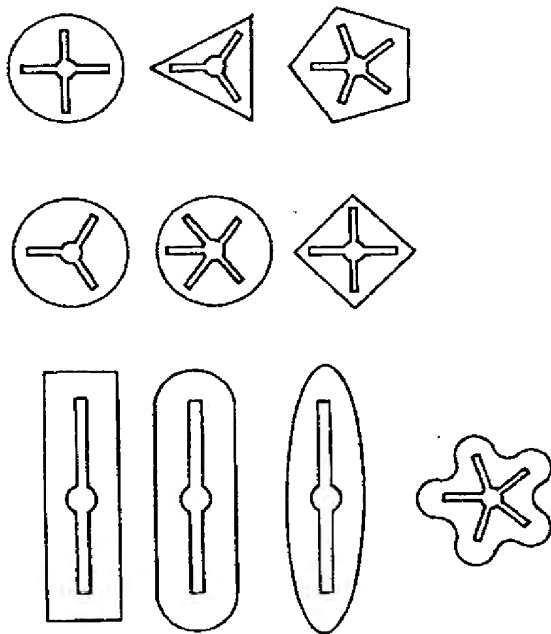
【図4】 カバーにおける観察窓の配置例を示す。

【図5】 注入孔構成部材の一例を示す。

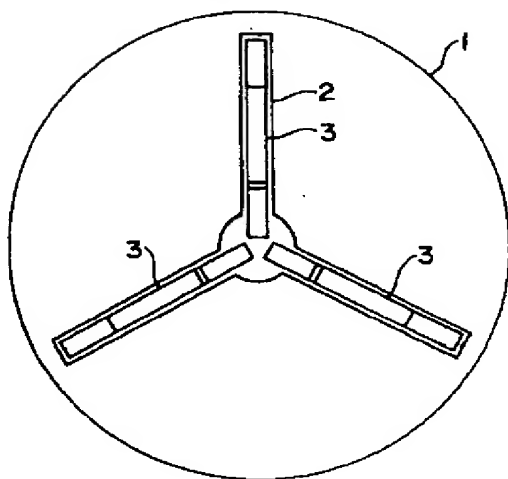
【図1】



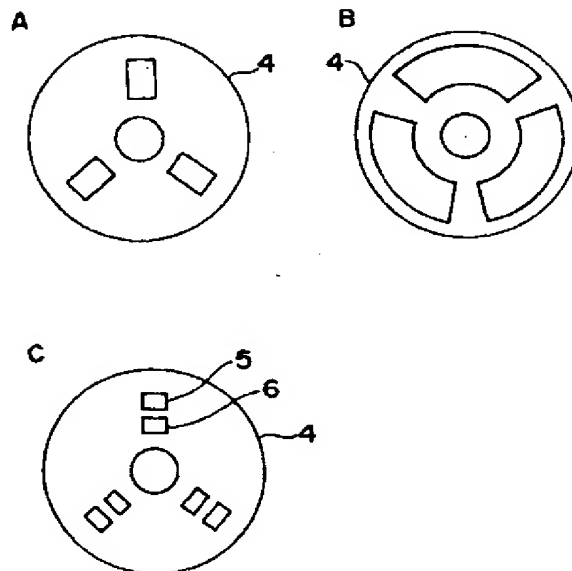
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

